

基于 DNA 条形码—产地—形态分析联用的巴西草药 *PICÃO*(鬼针草)的鉴定及生药学研究

顾选 张晓芹 宋晓娜 李妍芃 韩丽 赵百孝 刘春生 马长华 哈略

【摘要】 目的 对巴西鬼针草药材进行基原鉴定及生药学研究,为药材质量控制和开发应用提供依据。方法 提取样品总 DNA,扩增 ITS 基因序列,利用相似度搜索法进行分子鉴定。利用通过 DNA 条形码—产地—形态分析方法鉴定巴西鬼针草。按照 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)中方法分析样品性状、显微特征。结果 DNA 条形码—产地—形态分析联用的鉴定方法鉴定巴西鬼针草药材来源于菊科植物鬼针草 *Bidens pilosa*。结论 巴西鬼针草药材来源于菊科植物鬼针草 *Bidens pilosa*,生药学特征可以作为药材鉴定的依据。

【关键词】 巴西草药; 鬼针草; DNA 条形码; 生药学

【中图分类号】 R284 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.003

The varieties systematics research of Brzailian herb *PICÃO* based on a combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology GU Xuan, ZHANG Xiao-qin, SONG Xiao-na, et al. School of Chinese

Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: ZHAO Bai-xiao, E-mail: baixiao100@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To study the origin of Brazilian herbal *PICÃO* and do a pharmaceutical research,for providing a basis of quality control and development. **Methods** The source of varieties of Brazilian herb was identified by DNA barcoding technology, extracting DNA, amplifying ITS sequence. Then the result of DNA barcoding was checked by location information and morphological characteristics. Pharmaceutical research was done on the samples. **Results** *PICÃO* was identified as *Bidens pilosa* by

基金项目:国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院(张晓芹、刘春生、宋晓娜、李妍芃、马长华),针灸推拿学院(赵百孝、韩丽、哈略);北京华邈中药工程技术开发中心(顾选)

作者简介:顾选(1990-),女,硕士。研究方向:药用植物与分子生药学。E-mail:guxuan123.love@163.com

通讯作者:赵百孝(1963-),博士,教授,博士生导师,研究方向:针灸推拿。E-mail:baixiao100@gmail.com

DNA barcoding—origin—morphological analysis method. **Conclusion** Brazil herbs *PICÃO* is from *Bidens pilosa*. Pharmacognosy feature could provide a basis for identification.

【Key words】 Brazilian; *PICÃO*; DNA barcoding; Pharmacognosy

鬼针草类药材均来源于菊科管状花亚科鬼针草属 *Bidens* L. 植物, 为一年生草本植物。鬼针草类药材药用历史悠久, 为许多国家使用。中国的鬼针草药材来源有鬼针草 *B. pilosa*、金盏银盘 *B. biternata*、小花鬼针草 *B. parviflora* 等植物的干燥全草^[1], 其具清热解毒、活血散瘀功能, 主治上呼吸道感染、咽喉肿痛、急性黄疸型传染性肝炎等^[2]。巴西号称“植物王国”, 境内植物资源居世界首位。在巴西的部落里, 鬼针草药材 (*PICÃO*) 的应用也十分广泛。通过调查, 巴西鬼针草具有利尿, 净化血液, 消炎, 保护肝脏, 抗病菌, 抗原生动物, 退烧解热作用, 用于治疗黄疸病、泌尿感染, 阴道感染以及皮肤病的辅助治疗等。比较中巴鬼针草的治疗作用和临床应用情况, 有利于促进中国和巴西的医学交流, 扩大草药的用药范围。但是, 巴西鬼针草来源尚不明确, 限制了草药的开发利用。

DNA 条形码技术具有鉴别无背景信息中药材的优势, 能够准确鉴别到属、种水平, 产地和形态特征能进一步验证 DNA 条形码鉴定结果^[3]。本研究通过 DNA 条形码技术—产地—形态分析联用的方法对巴西鬼针草进行基原鉴定研究, 明确药材的来源。通过性状鉴别和显微鉴别法对巴西鬼针草进行生药学研究, 从器官、组织和细胞三个层次为药材鉴别提供依据, 对药材的开发利用和质量控制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2012 年 4 月采购巴西药用鬼针草 3 批, 购自巴西隆城市场。样品的凭证标本保存于北京中医药大学大学标本室。

1.2 试剂

广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (北京博迈德生物有限公司, 批号: 69632855)、Taq 酶等 PCR 试剂 (上海生工生物工程有限公司, 批号: 695673BE)、乙醇、琼脂糖、ddH₂O 等。

1.3 仪器

SIGMA3K-15 低温高速离心机 (SIGMA 公司), TECHNE TC-3000PCR 扩增仪, Bio-Rad 电泳仪, 水平电泳槽 (北京六一仪器厂), JS-680B 全自动凝胶

成像分析仪 (上海培清科技有限公司), GRANT 制冰机, 超纯水制备系统, KQ5200E 型超声波清洗器, SANYO-80℃ 超低温冰箱 (SANYO 公司), DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.4 DNA 提取及 PCR 扩增

取样品, 观察形态, 形态结果一致。取叶片进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉, 采用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。采用 ITS 序列通用引物在热循环扩增仪上进行扩增, PCR 扩增条件: 50 μL 体系含 2×Taq PCR MasterMix 25 μL, 引物 P1 和 P4 各加 2.5 μL (5 μmol/L), DNA 模板 4 μL, ddH₂O 16 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 分钟, 94℃ 变性 1 分钟, 55℃ 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 1 分钟, 40 个循环后, 72℃ 延伸 10 分钟^[3]。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下检视, 均由上海生工生物工程有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序, 以保证测序的准确性。

1.5 序列分析方法

利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接, 根据相似度搜索法 (BLAST 法) 所获相似度最高物种的同属 ITS 序列边界, 截取待鉴定物种的 ITS 序列, 分析样品序列特征。

1.6 基于 DNA 条形码的鉴定方法

根据相似度法鉴别物种: 以 90% 作为属水平鉴定的阈值, 以 97% 作为种水平的鉴定阈值。当物种相似度在 97% 以上, 最高相似度物种为鉴定结果; 当最高相似度物种相似度低于 97% 时, 认为数据未注册该序列, 鉴定到属水平。

1.7 基于产地分析的鉴定方法

根据“基于 DNA 条形码鉴定方法”项下获得的科、属和种的鉴定结果, 依据巴西植物志记载的巴西分布的该属植物物种信息, 依次分析最高相似度物种的产地是否相符合。

1.8 基于形态分析的鉴定方法

根据“基于产地分析的鉴定方法”项下获得的鉴定结果, 查询巴西植物志的形态信息, 核对形态特征, 进一步证实鉴定物种结果和入药部位。

1.9 巴西鬼针草的性状和显微特征研究

根据 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)中方法分析样品性状特征、显微横切特征、显微粉末特征。

2 结果与分析

2.1 基于 DNA 条形码的鉴定

样品的测序峰图良好,3 份平行样测序结果一致,各选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段,ITS 序列长度为 646 bp。经 BLAST 功能检索,样品与菊科鬼针草属植物相似度最高,均大于 97%;与植物鬼针草 *B. pilosa* 序列(U67106.1)相似度最高,相似度为 99%。因此,通过 DNA 条形码技术鉴别该药材基原为菊科植物鬼针草 *B. pilosa*。

2.2 基于产地分析的验证

根据调查,巴西部落有鬼针草植物分布,DNA 条形码鉴定结果符合植物地理分布特征。因此,根据 DNA 条形码与产地核对结果鉴定巴西鬼针草来源于菊科植物鬼针草。

2.3 基于形态分析的验证

茎钝四棱形,如图 1,叶为三出羽状复叶,小叶基部近圆形或阔楔形,有时偏斜,不对称,具短柄,边缘有锯齿、顶生小叶较大,长椭圆形或卵状长圆形。叶面具柔毛。根据形态分析,巴西鬼针草与植物志中鬼针草特征相符合,因此,根据 DNA 条形码-产地-形态分析的研究结果,鉴定巴西鬼针草的来源为菊科植物鬼针草 *B. pilosa* 的地上部分。



图 1 巴西鬼针草 PICÃO 样品的性状

2.4 巴西鬼针草的性状和显微研究

2.4.1 性状特征 从性状上看,样品经过切制加工,茎呈方形或近圆柱形,多切成段,长短不一,一般老茎较短,嫩茎较长。表面紫红色或紫棕色,少量或灰绿色或棕黄色,有纵向棱槽,茎上微附茸毛,节间明显,节膨大。质轻,易折断。断面白色,髓部海绵状,近节处或有中空。叶片皱缩卷曲,完整者展平后呈卵形或菱状卵形,灰绿色。叶对生,为羽状三出复叶,叶端渐尖,叶缘具均匀锯齿状,叶基渐狭,顶生小叶较大,叶基延展近翅状。叶柄较长,叶柄及叶面均具明显柔毛。质轻脆。气微特异,味微苦。

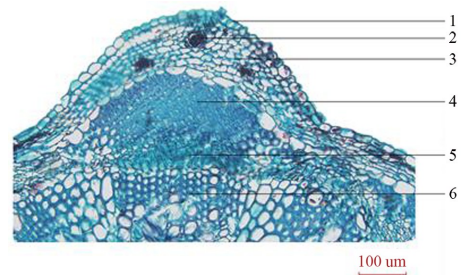
2.4.2 显微横切鉴定 采用石蜡切片制法制片,从显微横切面特征上观察茎叶特征。

茎呈类方形。表皮细胞 1 列,长方形,沿切向延长,有时可见少数非腺毛。皮层窄,由 5~6 列细胞组成,角隅处有乳汁管,四个角中每个角隅处有三个,四边中每个维管束上方有一个。维管束大小不等为外韧型,多个环列。韧皮部外侧分布有中柱鞘纤维,多半月形,断续呈环状排列。木质部导管大小不等,多被木质部纤维分隔断续径向排列。髓部发达,约为茎横切面的 2/3 以上,薄壁细胞向内逐渐增大,排列较疏松,如图 2-3。



1. 表皮 2. 皮层 3. 中柱鞘纤维 4. 韧皮部 5. 木质部 6. 髓

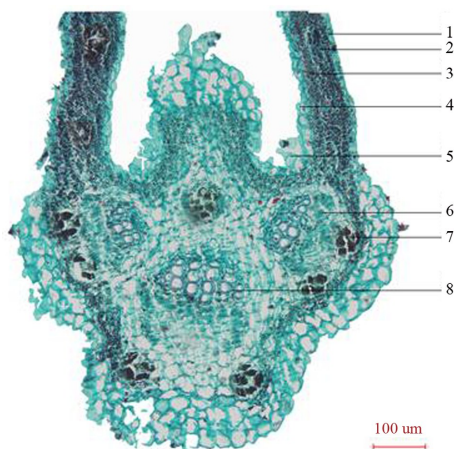
图 2 巴西鬼针草 PICÃO 样品茎的显微横切面



1. 表皮 2. 乳汁管 3. 皮层 4. 中柱鞘纤维 5. 韧皮部 6. 木质部

图 3 巴西鬼针草 PICÃO 样品的茎(部分)横切面

叶上表皮细胞 1 列,长方形,较大。下表皮细胞较小,类方形,气孔类型为不定式。表皮细胞上有非腺毛分布。栅栏组织由 1 列短圆柱形细胞组成,海绵组织较发达,细胞形状类圆形或不规则形。叶肉组织中含有分泌道。主脉处维管束 3 个,外韧型,木质部导管 2~4 个径向排列成行。韧皮部呈半月形,如图 4。



1. 下表皮 2. 海绵组织 3. 栅栏组织 4. 上表皮
5. 非腺毛 6. 韧皮部 7. 乳汁管 8. 木质部导管

图 4 巴西鬼针草 *PICÃO* 样品的主脉横切面图

2.4.3 显微粉末鉴定 粉末绿灰色或灰棕色。(1)非腺毛 呈锥形,由多个细胞组成,顶端锐尖或渐尖。(2)导管 多为具缘纹孔导管和螺纹导管,少见环纹和梯纹导管。(3)木纤维 多成束,细胞为长梭形,末端尖,多破碎,胞腔较窄,内可见纹孔。(4)叶表皮细胞 不规则形,大小不等,叶下表皮气孔为不定式。(5)花粉粒 球形,外壁具细刺状突起。(6)茎表皮细胞 排列整齐,近长方形。(7)髓薄壁细胞 为大型细胞,近长方形,壁较厚。(8)韧皮纤维呈梭形,常成群存在,胞腔呈线状。(9)棕色块略透明,具光泽,如图 5。

3 讨论

3.1 鬼针草的鉴定

研究人员对鬼针草鉴别做了大量研究。夏至等^[4]通过分子鉴定方法对中国鬼针草 7 个近缘种进行分析,结果表明,鬼针草能与其他近缘物种鉴别开,表明了 DNA 条形码对鬼针草药材的鉴别能力。刘圆等^[5]通过原植物、性状、显微和薄层鉴别的方法对民族药鬼针草进行生药学鉴定研究,表明



1. 非腺毛 2. 导管 3. 木纤维 4. 表皮细胞及气孔 5. 花粉粒
6. 表皮细胞(茎) 7. 薄壁细胞(髓) 8. 韧皮细胞 9. 棕色块

图 5 巴西鬼针草 *PICÃO* 样品的粉末图

生药学特征能够作为鬼针草的鉴别依据。本研究通过 DNA 条形码-产地-形态分析联用的方法鉴定巴西鬼针草来源于菊科植物鬼针草的地上部分。生药学研究为巴西鬼针草的品种鉴别和质量控制提供依据。

3.2 中巴用药经验交流的意义

通过比较中国和巴西鬼针草药材的用药经验,为中药扩大药用资源和新药开发提供依据,中国可以从巴西进口资源紧缺的品种;巴西植物药研究处于初级阶段,本研究为促进巴西草药的临床应用和化学、药理研究提供品种鉴定基础,巴西可以借鉴中国中药的研究基础和研究方法提高巴西草药的现代化水平;本研究为挖掘中国和巴西草药新资源提供参考,为中巴的传统医学交流奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 张延昌,张永明. 鬼针草的研究现状与应用前景[J]. 山东教育学院学报,2004,19(4):79-83.
- [2] 吴婷妮,余长柱,李荣,等. 鬼针草的研究进展[J]. 安徽医药,2014,(9):1614-1616.
- [3] 顾选,张晓芹,宋晓娜,等. 基于 DNA 条形码-产地-形态联用的药材溯源新方法研究——以黑果枸杞 1 种伪品为例[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4759-4762.
- [4] 夏至,高致明,李贺敏,等. 鬼针草及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究[J]. 中草药,2014,45(6):828-834.
- [5] 刘圆,王杰,彭镰心,等. 民族药鬼针草的生药学鉴定[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2006,32(3):568-571.
- [6] 胡伟,陈飞虎,吴繁荣,等. 鬼针草药材的生药学鉴定[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):329-330.

(收稿日期: 2015-08-18)

(本文编辑: 蒲晓田)